

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 東 裕美子

### 論文題目

Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*

### 論文内容の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は *SOD1* に加えて 2006 年に *TDP43*、2009 年に *FUS* がその原因遺伝子として報告された。TDP43 や *FUS* は RNA 結合蛋白質で機能的類似性があり、ともに RNA 代謝に関与するとされているが、その生体内の役割はまだ十分明らかにされていない。ショウジョウバエはヒト神経系を構成する遺伝子の約 75% のホモログを有し、多くの遺伝解析用ツールが整備されている。また GAL4/UAS 標的発現システムを用いることにより組織・発生時期特異的に標的遺伝子を過剰発現またはノックダウン (KD) させることが可能である。そこで我々は、2012 年 *FUS* のショウジョウバエホモログである *Cabeza* (以下 *Caz*) を KD したショウジョウバエ系統を樹立し、*Caz* の機能喪失が運動ニューロン障害を来すことを世界で初めて報告した。この *Caz*-KD ショウジョウバエを用いて、その表現型を修飾する因子を探索することを目的とした。

複眼原基特異的 *Caz*-KD ショウジョウバエを作製し、その成虫複眼を走査型電子顕微鏡 (KEYENCE VE7800) で観察した。この複眼特異的 *Caz*-KD による表現型を指標として家族性 ALS の原因遺伝子のショウジョウバエホモログに変異を有するショウジョウバエ系統を交配し、次世代の複眼表現型が増強・抑圧する系統をスクリーニングした。次に神経特異的 *Caz*-KD ショウジョウバエを作製し、運動能力と神経筋接合部 (NMJ) における運動ニューロンの形態を観察し、複眼特異的 *Caz*-KD のスクリーニングで得られた *ter94* との遺伝学的相互作用を調べた。運動能力測定 (climbing assay) は、tapping によってすべての成虫を底面に落とした後に成虫がガラス壁面を登るのを video で記録した。このステップを 5 回繰り返し、tapping 後の 30 秒間に 2cm 毎に付けられた目盛りを 1 匹が 1 つ超えると climbing score 1 点を与え、すべての成虫の score を合計したものを成虫の総数×5 (試行数) で除したものをその系統の平均の climbing score とした。Climbing assay は羽化後 3 日、7 日、14 日、21 日、28 日目まで調べた。運動ニューロンは、3 齢幼虫を HL3 saline 中で解剖を行い筋肉上の NMJ を分離して、4% paraformaldehyde/PBS で 30 分間固定し、2% BSA/PBS/0.1% TritonX-100 で 30 分間ブロッキングして、FITC 結合ヤギ抗 HRP 抗体で染色した。画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510) を用いて Z 軸方向に 1μm の間隔でスライスして得た各切片をマージさせた。第 4 筋肉上の NMJ における branch の長さを MetaMorph imaging system を用いて測定した。統計解析は GraphPad Prism を使い、独立二群間の比較解析は Mann-Whitney U test、独立した三群以上の統計解析は one-way ANOVA を用いて、その中の二群間の検定には Dunnett 検定を用いた。

複眼原基特異的 *Caz*-KD では個眼の融合や剛毛の消失などの rough eye 表現型を認め、*Caz*-KD による表現型を指標とした家族性 ALS の原因遺伝子のショウジョウバエホモログの突然変異のスクリーニングでは、*VCP* のショウジョウバエホモログ *ter94* 変異系統との交配により rough eye の増強が観察され、*ter94* 過剰発現系統との交配により rough eye が抑圧された。また、神経特異的 *Caz*-KD では運動能力が顕著に低下し、神経特異的 *Caz*-KD に *ter94* 変異系統を交配すると、さらに有意差を持って低下した。これに対して、神経特異的 *Caz*-KD に *ter94* 過剰発現系統を交配すると、14 日目までの一定期間は有意差をもって運動能力が改善した。次に運動ニューロンの長さを測定すると、神経特異的 *Caz*-KD では synaptic branch の短縮が観察され、神経特異的 *Caz*-KD に *ter94* 変異系統を交配すると、さらに有意差をもって短縮した。これに対して、神経特異的 *Caz*-KD に *ter94* 過剰発現系統を交配すると *Caz*-KD 単独に比べて synaptic branch の伸張が認められた。

我々が樹立した *Caz*-KD ショウジョウバエを用いて、これまでに報告されている家族性 ALS の原因遺伝子をスクリーニングすると、*Caz*-KD ショウジョウバエで認められた運動ニューロン障害を示す表現型は、*VCP* のショウジョウバエホモログ *ter94* の変異系統との交配によって増強、*ter94* 過剰発現系統との交配で抑圧された。これまでに、polyQ モデルショウジョウバエにおける複眼異常と *ter94* との相互作用については報告があり、polyQ モデルショウジョウバエの複眼異常は *ter94* 変異により抑圧され、*ter94* 過剰発現により増強する。つまり *ter94* の polyQ に対する効果と *Caz*-KD に対する効果は全く逆のものである。これらをふまえて、ヒトにおける *ter94* のホモログである *VCP* の *FUS* あるいは *TDP-43* に対する細胞内での作用を考察する。2010 年 Ritson らの報告によると、VCP は (A) RNP complex からの TDP-43 の除去、(B) 細胞質から核への shuttling 機能、(C) autophagy による分解への誘導などの、多彩な機能を有すると考えられている。我々は、先行する polyQ モデルの結果と今回の *Caz*-KD モデルでの結果を併せて、(B) の細胞質から核への shuttling を中心に考えれば、これらの現象の説明が出来ると考えた。*Caz*-KD では、*ter94* 変異により細胞質から核への shuttling 機能が働かなければ *Caz* の細胞質から核内への移行ができず、*ter94* 過剰発現により *Caz* の細胞質から核内への移行が増強されることで、核内での *Caz* タンパク量が増加するのではないかと考えている。これとは逆に、polyQ モデルでは核内に凝集体が出来る事が主たる病因であることから、*ter94* 過剰発現で細胞質から核への shuttling 機能が増強すれば polyQ 分子の核への供給が増加して核内凝集体が増え、*ter94* 変異で細胞質から核への shuttling 機能が低下すれば polyQ 分子の供給が低下し核内凝集体が減少する可能性がある。これらのことより、VCP は *FUS*/TDP-43 および polyQ の細胞質から核への shuttling の機能を担っている可能性が考えられる。今後は、ショウジョウバエにおける *TDP-43* のホモログである *TBPH* のノックダウンや変異系統を用いて *ter94* との相互作用を検討することや、ヒト細胞を用いて *FUS* と *VCP* の相互作用を検討すること、また VCP の細胞質から核への shuttling 機能を活性化する低分子化合物のスクリーニングなどの根本治療薬の探索を行う。